应用生态学报 2008年1月 第19卷 第1期
Chinese Journal of Applied Ecology, Jan. 2008, **19** (1): 218-222

蚯蚓对细菌降解土壤中菲的作用*

胡 淼 陈 欢 田 蕾 胡 锋 魏正贵 李辉信**
(南京农业大学资源与环境科学学院,南京 210095)

摘 要 通过30d室内培养试验,分别研究了接种蚯蚓(E)、细菌(B)以及同时接种细菌和蚯蚓(BE)对土壤中菲降解的影响.结果表明:在土壤中菲的初始污染浓度为50 mg·kg^{-1}的条件下,各处理间菲的降解率差异显著,其降解率的大小顺序依次为:BE>B>E>CK(对照);在150 mg·kg^{-1}菲的初始污染浓度下,BE处理中菲的降解率高达98.86%,显著高于CK和E处理.B处理中细菌的双加氧酶活性在3种菲初始污染浓度下没有显著差异,而BE处理中双加氧酶的活性随着土壤中菲的初始污染浓度的升高而增加.在相同菲污染浓度下BE处理中蚯蚓体内的菲含量明显高于E处理.表明蚯蚓能够通过生物富集作用降低土壤中菲的浓度,而蚯蚓与细菌的相互作用能够进一步促进土壤中菲的降解.

关键词 蚯蚓 假单胞菌 菲 双加氧酶
文章编号 1001-9332(2008)01-0218-05 **中图分类号** X53 **文献标识码** A

Role of earthworm in degradation of soil phenanthrene by *Pseudomonas putida*. HU Miao, CHEN Huan, TIAN Lei, HU Feng, WEI Zheng-gui, LI Hui-xin (*College of Resources & Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing* 210095, *China*). -*Chin. J. Appl. Ecol.*, 2008, **19** (1): 218-222.

Abstract: A 30-day incubation test was conducted to investigate the effects of treatments earthworm (E), bacteria (*Pseudomonas putida*) (B) and earthworm-bacteria (BE) on the degradation of soil phenanthrene. The degradation rate of soil phenanthrene at its initial concentration of 50 mg·kg^{-1} was in the sequence of BE>B>E>CK, and that at the concentration of 150 mg·kg^{-1} was 98.86% in BE, being significantly higher than that in CK and E. With the increase of the initial concentration of soil phenanthrene, the bacterial dioxygenase activity almost did not change in B, but increased significantly in BE. Under the same concentration of soil phenanthrene, the phenanthrene content in earthworm was significant higher in BE than in E, suggesting that earthworm could decrease the concentration of soil phenanthrene via its bioaccumulation, and the interaction between earthworm and *P. putida* could further promote the biodegradation of soil phenanthrene.

Key words: earthworm; *Pseudomonas putida*; phenanthrene; dioxygenase.

多环芳烃(PAHs)是由两个或两个以上的苯环以线形排列、弯接或簇聚的方式而构成.因其具有难降解性及致癌、致畸和致突变"三致"效应等而危害环境和人类健康.菲(Phenanthrene)属于低分子量的PAHs,它由3个苯环连接而成,具有一个Bay-region和一个K-region,这两个结构与多环芳烃的致癌性有紧密关系,因此,菲成为PAHs研究中的模式化合物.研究表明,生物降解是去除土壤中PAHs的主要机制[1-3],利用生物降解持久性有机污染物具有经济、环保等优点,是最有前景的修复手段.然而,在利用微生物修复受污染土壤的过程中,外源添加降解菌较差的传播和扩散能力以及受污染土壤中过低的氧含量等条件往往会限制污染物的降解.蚯蚓作为土壤生态环境中的重要组成部分,能够通过自身的生命活动促进有机污染物的降解.但关于在蚯蚓存在条件下有机污染物降解情况的研究还不多见[4-5].本文通过蚯蚓和细菌的单独和混合培养,研究蚯蚓和细菌及其相互作用对菲在土壤中降解的影响,旨在探究蚯蚓与微生物联合修复多环芳烃污染土壤的可行性.

*国家环境保护总局项目(江苏省土壤污染调查)和南京农业大学SRT资助项目(0607B17).
**通讯作者. E-mail: huixinli@njau.edu.cn
2007-02-07收稿,2007-11-07接受.

1 材料和方法

1.1 供试材料

菲购自德国 Fluka公司,分子量为 178.24,纯度≥97.0%.甲醇为色谱纯,其它常用试剂为分析纯.试验用主要仪器有:岛津 LC-20AT高效液相色谱仪(HPLC, SPD-20A/20AV紫外检测器)、KQ-250B超声波清洗仪、DL-5低速离心机、DHZ-C大容量恒温振荡器、515HD恒温培养箱及 BUCHI(B-490)旋转蒸发仪.

供试土壤为退化红壤,采自江西省鹰潭红壤生态实验站.土样采集后去除碎石、枯叶等杂物,自然风干、过 2 mm筛备用.基本理化性质见表 1.

表 1 供试土壤的基本理化性质

Tab.1 Basic physical and chemical properties of the test soil

pH	有机碳 Organic carbon ($g \cdot kg^{-1}$)	全氮 Total N ($g \cdot kg^{-1}$)	碳氮比 C/N	阳离子交换量 CEC ($cmol \cdot kg^{-1}$)	颗粒组成 Texture 砂粒 Sand (%)	粉粒 Silt (%)	粘粒 Clay (%)
5.41	5.80	0.51	11.37	1.69	29.01	30.81	18.65

供试细菌为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),购自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心,是菲降解试验中较常用的一种细菌.将购买菌种在无菌操作下接入液体牛肉膏蛋白胨培养基活化,28 ℃恒温摇床振荡培养 24 h,至均匀浑浊.吸取菌悬液转至固体培养基培养备用.

供试蚯蚓为赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*),购自南京市大厂区长芦镇普桥二组个体蚯蚓养殖场.试验选择形态大小均匀,有明显环带的成蚓,每条蚯蚓体重为(0.20 ±0.05) g

1.2 试验方法

将溶于正己烷中的菲与土样充分搅拌混匀,使土壤初始菲污染浓度达到 50、100、150 $mg \cdot kg^{-1}$,在黑暗条件下于通风橱中敞口放置 24 h,待溶剂挥发完毕后,于黑暗处老化 7 d[5].每个污染浓度水平下设 4个处理, CK表示空白试验、E表示接种蚯蚓、B表示接种细菌、BE表示接种蚯蚓和细菌,每个处理 3次重复.将 150 g菲污染的土壤加入 400 ml高脚玻璃烧杯(20 mm ×40 mm)中,需接种蚯蚓的处理加入 5条成蚓;需接种细菌的处理加入 1 ml菌悬液(10^8 CFU $\cdot g^{-1}$干土).试验中土壤水分维持在田间最大持水量的 60%,于 28 ℃恒温培养箱中黑暗培养 30 d.

培养结束后,从玻璃杯中挑出蚯蚓,此时蚯蚓体长减小,体重减轻,体表颜色加深,活动能力较差,成活率为 80%以上.挑出的蚯蚓用去离子水洗干净,放入垫有湿润滤纸的培养皿中 24 h,以排空肠道余物.然后将蚯蚓体表水分擦干并称量其质量,再用液氮速冻.将冻干后的蚯蚓和 2 g无水硫酸钠于玛瑙研钵中研碎,完全转移至玻璃离心管中,并用二氯甲烷提取,硅胶柱净化,用 HPLC检测菲的浓度[6-7].土壤中菲的测定参照文献[8-9]采用二氯甲烷 超声波萃取,硅胶柱净化, HPLC检测.

另外,对 B和 BE处理进行细菌的双加氧酶活性测定.将土壤与磷酸缓冲液 (0.02 $mmol \cdot L^{-1}$, pH 7.4)混合,在冰块上放置 1 h,不时用手振荡,然后将悬浊液在 15 ℃下 15 000 ×*g*离心 15 min.将上清液在 15 ℃下 5 000 ×*g*离心 15 min,即得粗酶液.向玻璃比色杯中加入 2.4 ml的 0.02 $mmol \cdot L^{-1}$磷酸缓冲液、0.4 ml 20 $\mu mol \cdot L^{-1}$的邻苯二酚溶液以及 0.2 ml的粗酶液,用手振荡混匀,在 37 ℃水浴中进行反应.记录反应初始时 375 nm处的吸光值,反应 30 min后,测定反应液在该波长的光吸收增加值.在标准测定条件下每分钟内 OD值变化 0.01为 1个酶活力单位[10-14].

1.3 数据处理

采用 Excel(2003)和 SPSS(13.0)对数据进行整理和分析.

2 材料与方法

2.1 蚯蚓与假单胞菌对菲降解的影响

从图 1可以看出,在相同菲初始污染浓度的条件下, E、B、BE处理中菲的残留浓度显著低于 CK处理;B、BE处理与 E处理也存在显著差异.表明单独接种蚯蚓、假单胞菌以及同时接种蚯蚓和假单胞菌都能显著促进土壤中菲的降解,接种假单胞菌以及同时接种蚯蚓和假单胞菌处理比单独投放蚯蚓处理的促进作用更为显著,说明本试验所选用的假单胞菌对菲具有较高的降解能力,在去除土壤中的菲的过程中起主要作用.在土壤初始污染浓度为 50 $mg \cdot kg^{-1}$条件下 BE处理中菲的残留浓度显著低于 B处理,而在另两个污染水平下没有差异.可能原因是随菲浓度的增高,菲对蚯蚓的毒性效应增强,这不仅影响了蚯蚓的生长,同时也减少了蚯蚓的活动[15],从而影响细菌对菲的降解.即在菲污染浓度较低时,蚯蚓能够促进细菌对菲的降解;在菲污染浓度较高时,这种促进作用不明显.

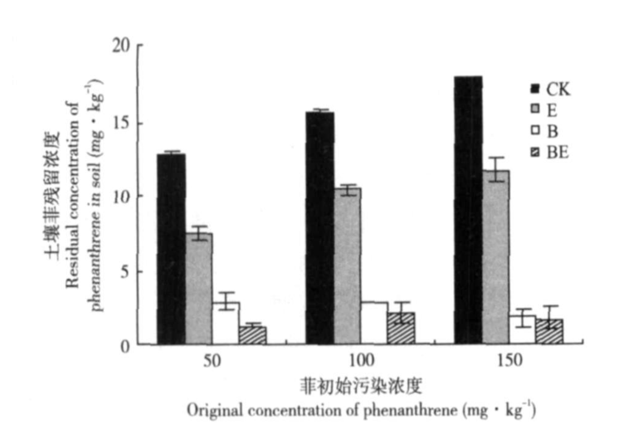


图 1 不同处理土壤中菲的残留浓度

Fig. 1 Residual concentrations of phenanthrene in soil under different treatments

未接种假单胞菌的处理中 (CK和 E)菲残留浓度随着土壤初始污染浓度的增加而增加,而接种假单胞菌的处理中 (B和 BE)菲残留浓度在 3 mg · kg^{-1}以下. 这是因为, 虽然假单胞菌具有较强的多环芳烃降解能力,但微生物对污染物的降解存在一定的阈值,由于微生物不能利用极低浓度的污染物,污染物的生物降解在较低浓度下会停止或减缓, 这是对污染土壤进行生物修复时普遍存在的问题[16]. 而添加蚯蚓能够促进微生物对土壤中污染物的降解,降低其降解阈值.

从表 2可以看出, 在相同菲的初始污染浓度下,各处理土壤中菲的降解率均高于对照,其中 BE处理中菲的降解率最高. 在 3个不同菲初始浓度下BE处理中菲的降解率分别为 97.53%、97.99%和 98.86%, 分别比对照 (CK)高 23.08%、13.67%和 10.75%. 当土壤中菲的初始污染浓度为 50 mg · kg^{-1}时,各处理的菲降解率差异显著,依次为 BE > B > E > CK 当土壤中菲初始污染浓度为 100和 150 mg · kg^{-1}时,BE和 B处理的菲降解率均无显著差异,但两者均高于对照 (CK)和 E处理. 随着土壤中菲的初始污染浓度增加,同一处理的菲降解率均有不同程度的提高. 与此类似, Lueprom cha等[17]研究发现,蚯蚓能促进多氯联苯 (PCB)降解菌的传播,使土壤中多氯联苯降解菌种群数量增加. Singer等[18]研究表明, 在添加蚯蚓的污染土壤中, PCB的降解率为 55%,而在未添加蚯蚓的污染土壤中, PCB的降解率仅为 39%. 而 Eijsackers等[19]也发现蚯蚓能够减少土壤中 PAHs的总量.

表 2 不同处理中菲的降解率

Tab. 2 Degradation rates of phenanthrene in different treatments (mean ±SD)

处理 Treatment	菲的降解率 (%) Degradation rate of phenanthrene 50 mg · kg^{-1}	100 mg · kg^{-1}	150 mg · kg^{-1}
CK	74.46 ±0.64 d	84.31 ±0.05 c	88.11 ±0.08 c
E	85.10 ±0.75 c	89.59 ±0.42 b	92.19 ±0.56 b
B	94.25 ±1.16 b	97.15 ±0.03 a	98.78 ±0.37 a
BE	97.53 ±0.17 a	97.99 ±0.68 a	98.86 ±0.52 a

同列不同字母表示处理间差异显著 (P < 0.05) Different letters in the same column meant significant statistical difference at 0.05 level

2.2 蚯蚓对土壤中菲的生物富集作用

从图 2可以看出, 在相同菲初始污染浓度下, BE处理蚯蚓体内的菲明显高于 E处理,表明土壤中的污染物通过蚯蚓的吸收作用而在蚯蚓体内富集,这一过程取决于化合物的两个主要化学性质,即持久性和可富集性. 蚯蚓富集土壤中的污染物通常有两种途径:被动扩散和摄食作用,前者是污染物从土壤溶液穿过体表进入蚯蚓体内;而后者则是污染物经过吞食作用进入蚯蚓体内,并在内脏器官内完成吸收作用[20]. 当环境中的污染物浓度升高或食物增多时,这种富集作用加强. Belfroid等[21]研究发现,蚯蚓能够通过体壁被动吸收溶解在土壤水溶液中的亲脂性有机污染物,还通过肠道吸收取食污染土壤中的有机污染物,并且增加取食食物中有机污染物的浓度能够导致蚯蚓体内有机污染物浓度的增加. Ma等[22]研究表明,蚯蚓能够提高土壤中 PAHs的降解率,并且蚯蚓能够富集土壤中 PAHs,这种富集作用随着土壤的老化和污染物生物利用率的降低而减小,而本试验中相同处理蚯蚓体内的菲浓度并未随着初始污染浓度的增加而增加,当土壤中菲的初始污染浓度为 100 mg · kg^{-1}时, E处理中蚯蚓体内的菲浓度最低,而 BE处理中的最高. 这可能是因为蚯蚓促进了假单胞菌对菲的降解,土壤中菲的浓度降低,蚯蚓体内的富集减少.

2.3 蚯蚓对假单胞菌双加氧酶活性的影响

双加氧酶是假单胞菌降解 PAHs过程中的关键

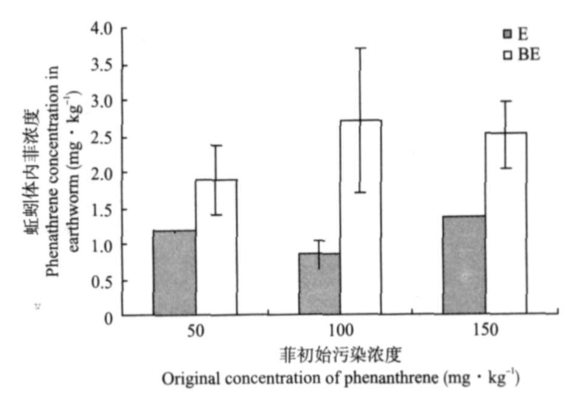


图 2 不同处理蚯蚓体内菲的浓度

Fig. 2 Phenanthrene concentration in earthworms under different treatments

酶. 双加氧酶为底物诱导性表达 ,其表达水平直接与环境中的芳烃量相关 ,其活力影响多环芳烃的降解速率[10]. 在一定污染浓度范围内 ,细菌的双加氧酶活力与菲降解率存在较好的相关性 ,对细菌降解菲的过程具有指示作用 ,可将双加氧酶活力作为菲降解程度的评价指标[12].

从图 3可以看出 ,当土壤菲的初始污染浓度为 150 mg·kg^{-1}时 ,BE处理中细菌的双加氧酶活性显著高于 B处理 ,而在另两个污染浓度下 ,BE处理和 B处理中的双加氧酶活性无显著差异. 随着土壤菲初始污染浓度的升高 ,BE处理中细菌的双加氧酶活性显著升高 ,而 B处理中细菌的双加氧酶活性无明显变化 ,可能是蚯蚓的活动改变了土壤的某些物理化学性质 ,使土壤中的污染物得以释放 ,诱导双加氧酶量增加 ,使酶活性提高[12-13,20,23-25].

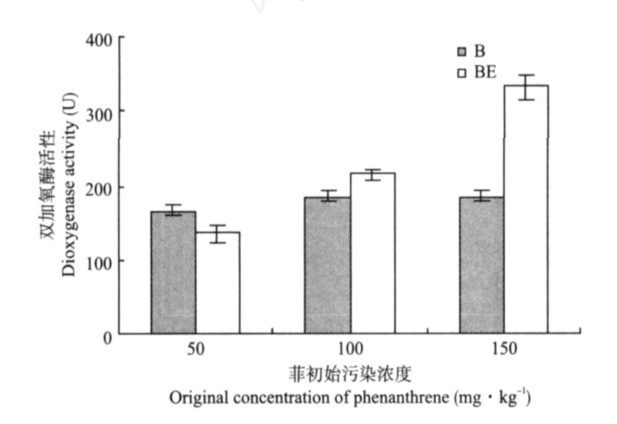


图 3　不同处理假单胞菌的双加氧酶活性

Fig. 3　Dioxygenase activity of *P. putida* in different treatments

3　结　　论

在本试验条件下 ,相同处理中土壤菲的降解率随着初始污染浓度的增加而增加;将蚯蚓与细菌混合培养时 ,蚯蚓能够促进细菌所分泌的双加氧酶的活性 ,蚯蚓体内的菲的浓度也有所增加 ,蚯蚓与细菌的相互作用能够进一步促进土壤中菲的降解. 相关机制有待进一步研究.

参考文献

[1] Keith LH, Telliard WA. Priority pollutants I-A perspective view. *Environmental Science and Technology*, 1995, **13**: 416-423

[2] Bücker M, Glatt HR, Platt KL. Mutagenicity of phenanthrene and K-region derivatives. *Mutation Research*, 1979, **66**: 337-348

[3] Wilson SC, Jones KC. Bioremediation of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Environmental Pollution*, 1993, **81**: 229-249

[4] Gao Y (高　岩), Luo Y-M (骆永明). Earthworms as bioindicators of soil pollution and their potential for remediation contaminated soil. *Acta Pedologica Sinica* (土壤学报), 2005, **42**(1): 140-148 (in Chinese)

[5] Ding K-Q (丁克强), Luo Y-M (骆永明), Liu X-L (刘世亮), *et al*. Remediation of phenanthrene contaminated soil by growing *Lolium multiflorum* Lam. *Soils* (土壤), 2002, **34**(4): 233-236 (in Chinese)

[6] Krauss M, Wilcke W, Zech W. Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) to earthworms in urban soils. *Environmental Science and Technology*, 2002, **34**: 4335-4340

[7] Li J-H (李久海), Pan G-X (潘根兴). Aging of spiked pyrene in two paddy soils and their particle size fractions after soil incubation and changes in extractability and bioavailability to earthworm. *Chinese Journal Environmental Science* (环境科学), 2005, **26**(6): 131-136 (in Chinese)

[8] Gao Y-Z (高彦征), Zhu L-Z (朱利中), Ling W-T (凌婉婷), *et al*. Analytical method for polycyclic aromatic drocarbons (PAHs) in plant and soil samples. *Journal of Agro-Environment Science* (农业环境科学学报), 2005, **24**(5): 1003-1006 (in Chinese)

[9] Song Y-F (宋玉芳), Qu Z-Q (区自清), Sun T-H (孙铁珩). Analytical method of polycyclic aromatic drocarbons (PAHs) in soil and plant samples. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 1995, **6**(1): 92-96 (in Chinese)

[10] Ma Y-F (马迎飞), Liu X-L (刘训理), Shao Z-Z (邵宗泽). Isolation of phenanthrene-degrading bacteria and analysis of their degrading-enzyme gene. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology* (应用与环境生物学报), 2005, **11**(2): 218-221 (in Chinese)

[11] Tian L (田　雷), Ma P (马　沛), Zhong J-J (钟建江). A new phenanthrene degrading strain and effect of exotic carbon source on its degradation characteristics. *Journal of East China University of Science and Technology* (Natural Science) (华东理工大学学报·自然科学版), 2002, **28**(2): 32-35 (in Chinese)

[12] Xu H-X (许华夏), Li P-J (李培军), Gong Z-Q (巩宗强), *et al*. Indicative function of dioxygenase activities on the degradation of phenanthrene by bacteria. *Chinese Journal of Ecology* (生态学杂志), 2005, **24**(7): 845-847 (in Chinese)

[13] Gramss G, Voigt KD, Kirsche B. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with three to seven aromatic rings by higher fungi in sterile and unsterile soils. *Biodegradation*, 1999, **10**: 51-62

[14] Zhu R-G (祝儒刚), Zhong M (钟　鸣), Zhou Q-X (周启星), *et al*. Isolation and identification of a phenanthrene degrading bacterial strain. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2006, **17**(11): 2117-2120 (in Chinese)

[15] Song Y-F (宋玉芳), Zhou Q-X (周启星), Xu H-X

(许华夏), *et al*. Effect of acute toxicity of phenanthrene, pyreneand 1, 2, 4 trichlorobenzene on earthworms in soil. *Rural Eco Environ* (农村生态环境), 2003, **19**(1): 36-39 (in Chinese)

[16] Hou S-Y (侯树宇), Zhang Q-M (张清敏), Duo M (多 淼), *et al*. Coordinated biodegration of pyrene by a consortium of white rot fungus and bacteria. *Journal of Agro-Environment Science* (农业环境科学学报), 2005, **24**(2): 318-321 (in Chinese)

[17] Luepromchai E, Singer AC, Yang CH, *et al*. Interactions of earthworms with indigenous and bioaugmented PCB-degrading bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, **41**(3): 191-197

[18] Singer AC, Jury W, Luepromchaia E, *et al*. Contribution of earthworms to PCB bioremediation. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, **33**(6): 765-776

[19] Eijsackers H, Van Gestel CAM, De Jonge S, *et al*. Polycyclic aromatic hydrocarbons-polluted dredged peat sediments and earthworms: A mutual interference. *Ecotoxicology*, 2001, **10**: 35-50

[20] Gao H-J (郜红建), Jiang X (蒋 新), Wei J-L (魏俊岭), *et al*. The rule of earthworms in bioaccumulation soil pollutants and environmental indication. *Chinese Agricultural Science Bulletin* (中国农学通报), 2006, **22**(11): 360-363

[21] Belfroid A, Meiling J, Drenth HJ, *et al*. Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (Eisenia andrei). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1995, **31**: 185-191

[22] Ma WC, Immerzeel J, Bodt J. Earthworms and food interactions on bioaccumulation and disappearance in soil of polycyclic aromatic hydrocarbons: Studies on phenanthrene and fluoranthene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1995, **32**: 226-232

[23] Zhang B-G (张宝贵). Interaction between earthworms and microorganisms. *Acta Ecolgica Sinica* (生态学报), 1997, **17**(5): 556-560 (in Chinese)

[24] Zhang B-G (张宝贵), Li G-T (李贵桐), Shen T-S (申天寿). Influence of the earthworm *Pheretima guillelmi* on soil microbial biomass and activity. *Acta Ecolgica Sinica* (生态学报), 2000, **20**(1): 168-172 (in Chinese)

[25] Wang D-D (王丹丹), Li H-X (李辉信), Hu F (胡锋), *et al*. Effects of earthworms on the microorganisms and enzyme activities in the Zn polluted soil. *Ecology and Environment* (生态环境), 2006, **15**(3): 538-542 (in Chinese)

作者简介 胡 淼,女,1981年生,硕士. 主要从事污染土壤修复和环境保护研究. E-mail: humiao1020@yahoo.com.cn

责任编辑 肖 红